Über eine neue Methode Dextrin und Glycogen aus thierischen Flüssigkeiten und Geweben abzuscheiden und über einige damit erlangte Resultate.

Von dem wirkl. Mitgliede **E. Brücke.**

Behufs einer im hiesigen physiologischen Institute durchzuführenden Versuchsreihe war es wünschenswerth eine verbesserte Methode zur Abscheidung des Glycogens aus thierischen Flüssigkeiten und Geweben zu besitzen. Bis jetzt wurden die Eiweisskörper durch Hitze coagulirt und aus der von ihnen abfiltrirten Flüssigkeit ein unreines Glycogen erhalten, das dann durch Kochen mit Kali und Wiederfällen mit Alkohol, Wiederauflösen in Wasser und Ausfällen mit Eisessig oder einem Gemenge von Alkohol und Essigsäure gereinigt wurde.

Ich suchte nach einem Reagens, das die stickstoffhaltigen Substanzen vollständiger abscheidet als die Coagulation durch Wärme und fand es in einer Lösung von Jodquecksilberkalium, die ich auf die gewöhnliche Weise bereitete, indem ich Jodkaliumlösung mit Sublimatlösung fällte, den Niederschlag auswusch und davon in einer heissen Jodkaliumlösung soviel auflöste als sie aufnahm.

Handelt es sich um nichts anderes als darum, reines Leberglycogen zu gewinnen, so wirft man die dem frisch getödteten Thiere entnommene Leber in siedendes Wasser und lässt sie darin schnell kochen; dann nimmt man sie heraus, zerreibt sie in einer Reibschale und gibt den Leberbrei in dasselbe Wasser zurück, kocht wieder durch einige Zeit und lässt erkalten, oder besser, man kühlt möglichst rasch durch Schnee oder durch kaltes Wasser, in das man das Gefäss setzt.

Nach dem Erkalten fügt man abwechselnd Jodquecksilberkalium und Chlorwasserstoffsäure so lange hinzu, als noch ein

Niederschlag entsteht, rührt gut durch und lässt eine kleine Weile (etwa 5 Minuten) stehen. Dann filtrirt man. Zu dem Filtrate fügt man unter stetem Umrühren soviel Weingeist, dass das Glycogen sich reichlich ausscheidet, nicht mehr, lässt absetzen und filtrirt. Dass man keinen Überschuss von Alkohol zusetzt, hat darin seinen Grund, dass ein solcher auch andere Substanzen fällen könnte, während das Glycogen, das schon in verdünntem Alkohol schwerlöslich ist, sich zuerst ausscheidet. Man wäscht deshalb auch anfangs mit Weingeist aus, der nur 60 bis 61 Volumprocent Alkohol enthält. Man wäscht damit so lange bis das abtropfende eine verdünnte Kalilösung, der man etwas Ammoniak oder Salmiaklösung zugesetzt hat, nicht mehr trübt.

Zeigt sich, dass das überflüssig zugesetzte Reagens vollständig ausgewaschen ist, und findet man, dass der abfliessende Weingeist auch keine Chlorverbindungen mehr enthält, so wäscht man mit Alkohol von 95 Volumprocent nach. Es ist dies deshalb nöthig, weil, wie schon frühere Beobachter bemerkten, das nur mit verdünntem Weingeist gewaschene Glycogen beim Trocknen am Filtrum festklebt. Das mit Alkohol von 95 Volumprocent gewaschene lässt sich leicht vom Filtrum schütten. Es verbrennt, in der beschriebenen Weise dargestellt, auf Platinblech ohne Rückstand, färbt sich mit Salpetersäure und Kali oder Ammoniak behandelt nicht gelb, gibt mit Natronkalk geglüht kein Ammoniak und auch die Probe von Lasaigne zeigt keinen Stickstoff in ihm an. Es ist also zur völligen Reinigung nur noch mit Äther auszuziehen, was passend gleich nach dem Auswaschen mit Alkohol geschieht.

Das reine unveränderte Glycogen färbt sich, so weit meine Erfahrung reicht, mit Jodlösung stets roth, nicht braun. Auch das Kochen mit Kali ändert hieran nichts. Ich habe aus Kaninchenfleisch, dass mit Kali völlig zerkocht war, Glycogen dargestellt, das durch Jod rein roth gefärbt wurde. Die Farbe scheint mir am schönsten zu sein, wenn das Glycogen vorher noch nicht getrocknet worden ist. Um sie gut zu erhalten, muss man einen Überschuss des Reagens vermeiden. Letzteres bereitet man sich am besten, indem man Jod in Substanz mit Wasser übergiesst und unter häufigem Schütteln in kleinen Portionen nur soviel

Jodkaliumlösung hinzufügt, dass das gelöste Jod die Flüssigkeit weingelb färbt.

Das Absorptionsspectrum des Jodglycogens zeigt keine Streifen, sondern eine allgemeine Absorption, die im Roth am schwächsten ist.

Ich kann bestätigen, dass das reine Leberglycogen die Polarisationsebene nach rechts dreht. Die Angabe, dass dies wegen der Undurchsichtigkeit der Lösungen nicht mit Sicherheit ermittelt werden könne, ist, wie Kühne mit Recht bemerkt, unbegründet.

Die Lösungen des reinen Glycogens sind in hohem Grade geeignet die Farben trüber Medien (vergl. meine Abhandlung in diesen Berichten Bd. 9 S. 530 und in Poggendorff's Annalen Bd. 88 S. 363) zu demonstriren. Sie geben sowohl das Blau des auffallenden, als auch das Gelb und Roth des durchfallenden Lichtes sehr schön.

Man kann die Procedür der Darstellung dahin abändern, dass man von dem gekochten Leberbrei die Flüssigkeit abfiltrirt und erst dann fällt: man spart dabei an Reagenz und überzeugt sich zugleich, wie gross die Masse der stickstoffhaltigen Substanzen ist, die durch Kochen nicht coagulirt, aber durch Jodquecksilberkalium gefällt werden.

Dies Verfahren kann man auch zur directen quantitativen Bestimmung des Glycogen der Leber benützen. Man kocht einmal nach dem andern mit kleinen Quantitäten Wasser aus, bis der Rückstand kein Glycogens mehr hergibt, wovon man sich überzeugt indem man eine kleine Probe der vorher ausgekühlten Abkochung mit Jodtinctur prüft[1].

---

[1] Es ist bekannt dass manche thierische Substanzen die Reaction von Jod auf Stärke, Dextrin und Glycogen hindern, dass sie in anderen Fällen zwar eintritt, aber trotz Zusatz von Salpetersäure sofort wieder verschwindet. Bessere Dienste als die Salpetersäure hat mir in solchen Fällen das Eisenchlorid geleistet, um die Reaction haltbar zu machen. Dass auch die Bestandtheile des Harnes in hohem Grade die Jodreaction hindern, scheint trotz der ausführlichen Untersuchungen, die von Vintschgau (Diese Berichte Bd. 54, 2te Abth. S. 288) über diesen Gegenstand angestellt hat, noch immer nicht hinreichend beachtet zu werden. Noch immer kann man gelegentlich lesen „dass der Harn keine Jodreaction gezeigt habe". Erhält man

Die gesammelte Flüssigkeit engt man ein, nachdem man sie, falls sie sauer reagirt (was übrigens, so weit meine Erfahrung reicht, nur in geringem Grade der Fall ist), neutralisirt hat; dann fällt man mit Salzsäure und Jodquecksilberkalium, filtrirt, wäscht mit wenig Wasser, das mit beiden Reagentien versetzt wird, aus und vereinigt das Waschwasser mit dem Filtrate. Nun fällt man mit Alkohol. Es kann hier die Frage entstehen, wie viel Alkohol man hinzufügen soll. Fügt man zu wenig hinzu, so kann man befürchten, dass das Glycogen sich nicht vollständig ausscheide, fügt man zu viel hinzu, dass auch noch andere Substanzen gefällt werden. Ich hatte bei einem Versuche nur soviel hinzugefügt, dass die Flüssigkeit 60 Volumprocent Alkohol enthielt; dann setzte sich das Glycogen vollständig zu Boden. Die darüber stehende Flüssigkeit war klar und gab kein Glycogen mehr. Da ich aber bemerkte, dass beim Waschen mit Weingeist von 61 Volumprocent in der abgeflossenen über dem Filtrate lagernden Waschflüssigkeit eine leichte Trübung entstand, so löste ich reines Glycogen in Wasser auf und setzte so viel Alkohol hinzu, dass die Flüssigkeit 61 Volumprocent davon enthielt. Das Glycogen setzte sich nur unvollständig ab, und die Flüssigkeit blieb milchig getrübt. Als ich sie filtrirte, gab das Filtrat nach dem Abdampfen einen, wenn auch geringen Rückstand, der sich mit Jodtinctur röthete. Als ich aber zu einer Probe der trüben Flüssigkeit etwas Eisessig hinzusetzte, schied sich das Glycogen vollständig ab, und zwar zu einer Zeit, als eine andere Probe, die ich mit mehr starkem Alkohol versetzt hatte, noch immer milchig getrübt war. Das beste wird also wohl sein, bei quantitativen Versuchen zunächst so viel Alkohol zuzusetzen, dass davon im Gemische 60 Volum-

---

bei der directen Prüfung des Harns auf Jod ein negatives Resultat, so hat man ihn mit kohlensauren Natron bis zur stark alkalischen Reaction zu versetzen, einzudampfen, zu verkohlen, die Kohle auszulaugen und die erhaltene Flüssigkeit auf Jodverbindungen zu untersuchen. Ich will beiläufig bemerken, dass ich mich auf diesem Wege überzeugt habe, dass bei energischen Jodeinpinselungen auf die äussere unversehrte Haut nicht unbeträchtliche Mengen von Jod resorbirt und durch die Nieren wieder ausgeschieden werden können.

procent enthalten sind, wenn sich das Glycogen gut ausscheidet, die klare Flüssigkeit abzufiltriren und dann mit Weingeist auszuwaschen, dem man Eisessig zugesetzt hat.

Wenn man das Verhalten des Glycogens beim Auflösen und Widerausfällen beobachtet, kommt man zu der Überzeugung, dass diese Processe nur im Aufquellen und wieder Verschrumpfen kleiner Klümpchen bestehen. Dass diese Klümpchen ihren Zusammenhang, ihre Eigenschaft als feste Theile, niemals aufgeben zeigt schon das Opalisiren selbst verdünnter Lösungen. Das Licht, welches sie aus ihrem Innern zerstreuen ist polarisirtes. Wenn nichts desto weniger das sogenannte gelöste Glycogen durchs Filtrum geht, so liegt dies nur daran, dass die Klümpchen durch das Aufquellen hinreichend weich und schlüpfrig geworden sind um sich durch die Maschen des Filtrums hindurchzuwinden. Gehen ja beim Filtriren des Blutes die ganzen Blutkörperchen durchs Filtrum und können erst auf demselben gesammelt werden, nachdem man sie durch schwefelsaures Natron zum Verschrumpfen gebracht hat.

In dieser Beschaffenheit des Glycogens liegt ein Vortheil für die quantitative Bestimmung. Hat sich das Glycogen einmal so weit ausgeschieden, dass sich die darüber stehende Flüssigkeit vollständig klärte, so ist auch nichts mehr davon in Lösung. Man kann deshalb fällen und wieder auflösen, wieder fällen u. s. w. ohne dabei Verlust zu erleiden.

Aus dem Fleische kann man das Glycogen auch durch Auskochen, Fällen der Brühe mit Salzsäure und Jodquecksilberkalium u. s. w. erhalten. Da sich aber das Fleisch viel schwerer zerkleinern lässt (am besten noch durch das von Kühne für die Leber angegebene Verfahren, indem man es mit erhitztem Sand im Mörser zerreibt. Ich wendete statt dessen erhitzten groben Steinschneiderquarz an, der wegen seiner schneidigen Kanten noch besser wirkt) als die Leber, so kann es einen Theil des Glycogens hartnäckiger zurückhalten. Man kann auch das zerkleinerte Fleisch in eine verdünnte Lösung von kohlensaurem Kali werfen, es damit anhaltend kochen, einen Theil des Wassers verdampfen, dann erkalten lassen, ohne zu filtriren Salzsäure und Jodquecksilberkalium zusetzen, nun filtriren und aus dem Filtrate mit Alkohol fällen. Ein anderes Verfahren besteht darin,

dass man dem siedenden Wasser, in das man das gröblich zerkleinerte frische Fleisch wirft, vorher etwas Kalilösung zusetzt und es damit vollständig zerkocht. Die so erhaltene Lösung fällt man, nachdem sie erkaltet ist, mit Salzsäure und Jodquecksilberkalium und filtrirt. Will man das Glycogen quantitativ bestimmen, so wäscht man den Niederschlag mit Wasser, das mit den Reagentien versetzt ist, aus und vereinigt das Waschwasser mit dem Filtrat. Nun fällt man mit Alkohol, filtrirt und reinigt das erhaltene Glycogen durch Wiederauflösen in Wasser, Ansäuern und Fällen mit Alkohol, um es schliesslich, nachdem es mit Alkohol gewaschen und mit Äther extrahirt ist, zu wägen.

Indem ich das Zerkochen des Fleisches mit Kali behufs der quantitativen Bestimmung vorschlage, sehe ich die bisher allgemein gemachte Annahme, dass das Glycogen auch in der Siedhitze für Kalilösung völlig unangreifbar sei, als richtig an. Ich habe diese Annahme nicht durch specielle quantitative Versuche geprüft, aber sie scheint in der That gerechtfertigt. Bei einem Versuche hatte ich das vom frisch getödteten Kaninchen heruntergeschnittene Fleisch nicht zerkleinert. Ich hatte es in grossen Stücken in die heisse Kalilösung geworfen und musste in Folge davon sehr lange kochen ehe sich alles aufgelöst hatte. Ich erhielt dennoch eine ähnliche Ausbeute wie in andern Versuchen. Es ist kaum glaublich, dass ich in diesem Versuche überhaupt noch Glycogen erhalten hätte, wenn dasselbe auch nur langsam von Kali angegriffen würde.

Ehe man indessen das Zerkochen mit Kali bei quantitativen Bestimmungen anwendet, wird es gut sein diese Annahme noch einmal einer sorgfältigen experimentellen Prüfung zu unterwerfen.

In ähnlicher Weise wie zur Abscheidung des Glycogens kann man das Jodquecksilberkalium auch zur Abscheidung des Dextrins aus Gemengen von stickstoffhaltigen Substanzen, oder vielmehr zur Abscheidung der letzteren benützen. So habe ich es mit Vortheil angewendet, um das bei der Pankreasverdauung gebildete Dextrin aus dem Verdauungsgemische abzuscheiden.

Es kann auch noch in anderen Fällen nützlich sein, in denen man sich der stickstoffhaltigen Substanzen ohne Anwendung von Zerstörungsmitteln möglichst vollständig entledigen will: so zur

quantitativen Bestimmung der im lebenden Blute thatsächlich vorhandenen phosphorsauren und schwefelsauren Salze. Als ich Pferdeserum mit Jodquecksilberkalium und Salzsäure versetzt hatte, konnte ich von dem Niederschlage eine sehr leicht filtrirbare klare Flüssigkeit abfiltriren, aus der Chlorbarium schwefelsauren Baryt fällte, während eine andere Portion derselben mit schwefelsaurer Magnesia und Ammoniak, Krystalle von phosphorsaurer Ammoniakmagnesia gab.

Ich habe die neue Methode zunächst benützt um einige Versuche über die Verbreitung des Glycogens in erwachsenen Thieren anzustellen.

In den Muskeln von Kaninchen, in denen O. Nasse (Beiträge zur Physiologie der contractilen Substanzen, Pflüger's Archiv Bd. II, S. 97) es bereits verfolgt hat, habe ich es wiederholt gesucht und gefunden. Ebenso fand ich es in den Muskeln eines mehr als schuhlangen Karpfen. Es war darin in solcher Menge enthalten, dass die vom Jodquecksilberkalium-Niederschlage abfiltrirte Flüssigkeit schon sehr deutlich opalisirte. Auch in nicht quergestreiften Muskelfasern kommt es vor. Ich habe es in der frischen Muskelhaut eines Schweinsmagens nachweisen können, die ich in verdünnter Kalilauge zerkochte.

Ob es im Blut vorkomme, darüber wiedersprechen die bisherigen Angaben einander. A. Sanson [De l'origine du sucre dans l'oeconomie animale. Journal de physiologie publ. sous la direction de Brown-Sequard. Tome I (1858) p. 244] gab an, es im Blute und zwar in erheblicher Quantität gefunden zu haben. Es musste indessen Misstrauen in seine Angabe erregen, dass er sagte, der Körper habe sich mit Jod violett gefärbt (l. c. S. 256 und 259), was bekanntlich Glycogen niemals thut. Auch unterschied er es nicht vom Dextrin. Er hielt ja Bernard's Glycogen gar nicht für einen neuen Körper, sondern nur für Dextrin, das mit den Nahrungsmitteln in den Thierkörper hineingekommen oder in diesem aus Stärke entstanden sei.

Später untersuchte O. Nasse das Blut und gab an, dass darin nicht nur kein Glycogen, sondern überhaupt keine amylum- oder dextrinartige Substanz vorhanden sei. (De materiis amylaceis num in sanguine animalium inveniantur disquisitio. Halis MDCCCLXVI.)

Nur die Möglichkeit, dass sich in jungen Blutkörperchen, wie in anderen jungen Zellen, Glycogen befinden möge, liess er offen, da ihm seine Versuche darüber nicht ganz genügten. Er hatte, nachdem er das in Alkohol unlösliche des wässrigen Auszugs von gekochtem Blute mit Schwefelsäure gekocht, eine reducirende Substanz erhalten. Aber er glaubte dieselbe nicht für Zucker, sondern eher für irgend ein reducirendes Zersetzungsproduct der Eiweisskörper ansprechen zu müssen.

Nasse's Angaben musste ein besonderes Gewicht beigelegt werden, weil er in dem ersten Theile der Schrift eine genaue, durch eigene Untersuchungen erworbene Kenntniss der stärkemehl- und dextrinartigen Kohlehydrate und ihrer Reactionen an den Tag legt, eine genauere, als sie sich bei irgend einem der früheren Beobachter zeigt.

In der That fand ich auch bei meinen ersten Versuchen theils nur undeutliche, theils deutliche, aber doch nur geringe Spuren eines sich mit Jodkaliumjodlösung roth färbenden Körpers; dann aber trat die Reaction in einem weiteren Falle viel intensiver auf. Es gelang mir indessen nicht genug Substanz zu gewinnen, um zu entscheiden, ob der Körper Glycogen oder Dextrin sei. Die Farbe konnte hierüber keinen Aufschluss geben, indem, wie Nasse richtig bemerkt, auch das Dextrin sich mit Jod nur roth färbt, und die violette Reaction des käuflichen Dextrins von beigemengter löslicher Stärke (Nasse's Amidulin) herrührt. Ich hatte bisher mit Kaninchenblut, also mit verhältnissmässig kleinen Mengen gearbeitet. Um grössere Mengen zu verarbeiten liess ich mir beim Schweineschlächter Blut in zwei Portionen auffangen, die eine in Weingeist die andere in Kalilösung. Die letztere kochte ich eine Weile und fällte dann mit Jodkaliumquecksilberlösung. Die erstere theilte ich, nachdem sie von Alkohol befreit war, in zwei Theile, deren einen ich mit Wasser, deren andern ich mit einer verdünnten Lösung von kohlensaurem Kali auskochte und dann in der gewöhnlichen Weise weiter arbeitete. Aber in keinem dieser Fälle erhielt ich genug Substanz, im Maximum kaum so viel, dass die Reaction als hinreichend rein und deutlich bezeichnet werden konnte.

Eine ähnliche Controverse wie über das Blut existirt zwischen Nasse und Sanson über die Milz. Ich habe aus der Schweine-

milz eine sich mit Jod roth färbende Substanz erhalten, offenbar zum Theile Glycogen, das aus den Muskelfasern der Milz, beziehungsweise aus den Muskelfasern ihrer Gefässe stammte. Von den Nieren, in denen nach Sanson auch Dextrin vorkommt, erhielt ich nur eine schwache Reaction; ich kann aber nicht sagen, dass ich hier alles erhalten hätte, da Milz und Nieren vom Schweine erst vom Fleischhauer ins Laboratorium getragen wurden, ehe ich sie in Arbeit nahm.

In Rücksicht auf die secernirende Milchdrüse (des Kaninchens) kann ich im wesentlichen Nasse's Angaben bestätigen. Ich erhielt zwar von der frisch verarbeiteten Milchdrüse eine schwache Reaction, aber sie war so unbedeutend, dass von einem Aufgespeichertsein von Glycogen behufs der Umwandlung in Milchzucker nicht die Rede sein konnte.